

## (Verdenking van) botulisme bij melkvee: voedselveiligheidsaspecten en maatregelen

<sup>1</sup>X. Van Huffel, <sup>1</sup>S. Cardoen, <sup>1</sup>L. Vanholme, <sup>2,3</sup>H. Imberechts, <sup>2,4</sup>K. Dierick, <sup>2,5</sup>J. Debevere, <sup>2,6</sup>G. Daube, <sup>2,7</sup>L. Herman, <sup>8</sup>P. Deprez, <sup>8</sup>F. Haesebrouck

<sup>1</sup>Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, WTC III, Simon Bolivarlaan 30, B-1000 Brussel

<sup>2</sup>Wetenschappelijk Comité Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, WTC III, Simon Bolivarlaan 30, B-1000 Brussel

<sup>3</sup>Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Groeselenberg 99, B-1180 Ukkel

<sup>4</sup>Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid, J. Wytmanstraat 14, B-1050 Brussel

<sup>5</sup>Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent, Coupure Links 653, B-9000 Gent

<sup>6</sup>Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, B-4000 Liège

<sup>7</sup>Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle

<sup>8</sup>Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820, Merelbeke

xavier.vanhuffel@favv.be

### SAMENVATTING

Naar aanleiding van enkele uitbraken van botulisme bij melkvee in België gedurende de laatste jaren worden in dit artikel de voedselveiligheidsaspecten die daaraan verbonden zijn nader besproken evenals de maatregelen die kunnen genomen worden op het melkveebedrijf en in de voedselketen ter vrijwaring van de blootstelling van de consument aan eventuele gezondheidsrisico's. Uit een kwalitatieve risico-evaluatie is gebleken dat het risico op overdracht van botulismetoxinen via verwerkte melk naar de consument zeer laag is. De fecale contaminatie van de uier en melk door *Clostridium botulinum* sporen kan in geval van type B daarentegen een risico op de ontwikkeling van botulisme bij gevoelige mensen vormen. Bovendien kunnen in rauwe en laag verhitte melk- en zuivelproducten toxinen worden geproduceerd na de ontkieming van deze sporen.

### INLEIDING

Sporadisch komen op melkveebedrijven neurologische afwijkingen (voortschrijdende parese/paralyse) met sterfte voor bij meerdere volwassen runderen. Op basis van de anamnese en het klinisch onderzoek kan een verdenking van botulisme ingesteld worden. De bevestiging van deze vermoedelijke diagnose door de detectie en identificatie van het neurotoxine in weefsels van het dier en de identificatie van de besmettingsbron van het toxine neemt enige tijd in beslag. Dikwijls blijven de laboratoriumanalyses negatief (Trueman *et al.*, 1992). Intussen stelt zich de vraag wat het risico is voor de voedselveiligheid en welke maatregelen er kunnen of dienen genomen te worden op bedrijfsniveau en in de voedselketen om uit voorzorg de consument te beschermen.

*Clostridium botulinum* neurotoxinen behoren tot de meest krachtige en dodelijke toxinen voor mens en dier. Door het blokkeren van de neuromusculaire verbindingen ontstaat een algemene spierparese tot -paralyse, ook van de ademhalingspijpen, en dit kan uiteindelijk tot sterfte leiden. De aanwezigheid van botulisme op een voedselproducerend bedrijf dient dus steeds als een ernstige zaak beschouwd te worden, aangezien zowel dier als mens gevoelig zijn voor bepaalde neurotoxinen.

Zolang het neurotoxinetypen niet daadwerkelijk is geïdentificeerd, kan slechts een vermoedelijke diagnose van botulisme worden gesteld en steunen de te nemen maatregelen voornamelijk op het voorzorgsbeginsel. Het voorzorgsbeginsel is opgenomen in Verordening (EG) 178/2002 van het Europees Parlement en de Raad, ook "algemene levensmiddelenwet" genoemd. Hierin wordt bepaald dat "in specifieke situaties waarin na beoordeling van de beschikbare informatie de mogelijkheid van schadelijke gevolgen voor de gezondheid is geconstateerd, maar er nog wetenschappelijke onzekerheid heerst, kunnen er in afwachting van nadere wetenschappelijke gegevens ten behoeve van een vollediger risicobeoordeling, voorlopige maatregelen voor risicomanagement worden vastgesteld om het in de Gemeenschap gekozen hoge niveau van gezondheidsbescherming te waarborgen".

In dit artikel worden de voedselveiligheidsaspecten die verbonden zijn met de verdenking of het voorkomen van botulisme op melkveebedrijven beschreven en de maatregelen die kunnen genomen worden ter vrijwaring van de blootstelling van de consument aan eventuele gezondheidsrisico's.

## BOTULISME BIJ MELKVEE

### Voorkomen en verloop van botulisme bij melkvee in België

Sinds 2005 werden aan het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) vier uitbraken van botulisme bij runderen gemeld. Deze waren alle gelokaliseerd in de provincie West-Vlaanderen. Een eerste geval (november 2005) kwam voor op een gemengd rundvee- en braadkippenbedrijf bestaande uit een 100-tal rundvee-eenheden. Bewegingsstoornissen werden waargenomen bij 3 melkkoeien in lactatie. In totaal stierven 7 koeien op korte termijn. *Clostridium botulinum* type D werd geïsoleerd uit de lever van één dier. Een tweede geval (november 2006) kwam voor op een melkveebedrijf. Na het optreden van zenuwsymptomen stierven binnen een periode van ongeveer één maand 22 van de 52 dieren. *Clostridium botulinum* type D-toxine werd geïdentificeerd in de lever en in het mengvoeder. Op een derde bedrijf stierven in een tijdspanne van enkele weken (februari 2007) 10 van de 54 melkkoeien na symptomen van tetraplegie en lusteloosheid. De geanalyseerde stalen (kuilvoeder en bloed) waren negatief voor *Clostridium botulinum* toxinen. Het bedrijf werd in verdenking van botulisme gesteld. Op een vierde rundveebedrijf (mei 2007) met 47 runderen beperkten de symptomen zich tot 7 runderen die zich op een afgelegen weide bevonden. Twee dieren stierven en bij een derde dier met persisterende paralyse werd *Clostridium botulinum* type D-toxine geïsoleerd uit een leverstaal. Op deze vier bedrijven waren geen duidelijke aanwijzingen van de oorzaak van intoxicatie.

### Diagnose van botulisme bij rundvee

Een verdenking van botulisme bij rundvee wordt gesteld op basis van de anamnese en typische klinische symptomen bij meerdere dieren, door de uitsluiting van andere oorzaken van motorische paralyse en door het optreden van sterfte bij één of meerdere volwassen dieren. Bij autopsie worden geen specifieke letsels waargenomen behalve secundaire veranderingen, zoals aspiratiepneumonie of longoedeem en in sommige gevallen een hemorragische enteritis ter hoogte van de proximale dundarmgedeelten (Martel, 2003).

Het ziektebeeld bij botulisme veroorzaakt door *Clostridium botulinum* type C en type D is zeer typisch en bestaat vooral uit symptomen van parese of paralyse van het bewegingsapparaat in combinatie met een plotse dood van meerdere dieren van het beslag. In het geval van *Clostridium botulinum* type B bestaat het ziektebeeld aanvankelijk eerder uit spijsverteringsstoornissen, zoals moeilijkheden bij het slikken, een overvloedige speekselafscheiding en eventueel koliek, diarree of constipatie (Bruckstein en Tromp, 2001).

In de differentiaaldiagnose van botulisme moet rekening gehouden worden met infectieuze (meningo-) encefaliden, zoals listeriose, rabiës of de ziekte van Aujeszky, intoxicaties met organische fosforverbindingen, koper, kwik of lood en onevenwichten in de

mineraalhuishouding (bijvoorbeeld hypocalcemie). Andere intoxicaties, zoals bijvoorbeeld "raaigrasstaggers", pyrrolizidinen, geven doorgaans andere symptomen. De lijst van mogelijke intoxicaties is theoretisch lang maar in die gevallen wordt het klinisch beeld meestal door andere symptomen, zoals maagdarmaandoeningen en orgaanletsels, gedomineerd.

De gebruikelijke bevestiging van botulisme berust op een letaliteit bioassay bij muizen in combinatie met een toxineutraliserende test. Deze worden in België uitgevoerd aan het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid-Departement Pasteur Instituut, het nationaal referentielaboratorium voor botulisme. Voor de staalname komen bij levende dieren met acute klinische symptomen voornamelijk serum, feces en pensinhoud in aanmerking. Bij gestorven dieren worden het beste lever of darminhoud gepreleveerd. Voor wat het voeder betreft dient men zich bij de staalname te richten op verdachte plaatsen in silovoeder in de nabijheid van recent opgenomen ruwvoeder en op de aanwezigheid van resten van krengen. In de hogerbeschreven verdenkingen van botulisme werd *Clostridium botulinum* type D-toxine aangetoond in leverstalen van gestorven koeien (op 3 van de 4 bedrijven), in maaginhoud (1 maal) en in mengvoeder (1 maal).

### Oorsprong van botulisme bij melkvee

Botulisme bij rundvee wordt veroorzaakt door de opname van toxinen overwegend afkomstig van *Clostridium botulinum* type C en type D (Cobb *et al.*, 2002) maar ook van type B (Haagsma en Ter Laak, 1978; Divers *et al.*, 1986; Kelch *et al.*, 2000; Bruckstein en Tromp, 2001; Böhnelt *et al.*, 2005). Uitzonderlijk werd *Clostridium botulinum* type A (Prévot en Brygoo, 1953) in verband gebracht met botulisme bij rundvee.

De toxinen van *Clostridium botulinum* type C en D zijn meestal afkomstig van krengen van vogels of ongedierte die zich bevinden in het kuilvoeder, op het grasland of in het water (Mc Ilroy en Cracken, 1987). Toxinen van *Clostridium botulinum* type B ontwikkelen zich in nat hooi, slecht kuilvoeder of natte bierbostel (Notermans *et al.*, 1979 en 1981, Chiers *et al.*, 1998, Kelch *et al.*, 2000).

De termijn tussen de blootstelling van runderen aan het toxine en het optreden van klinische symptomen varieert van 2 tot 17 dagen (Moeller, 2000; Cobb *et al.*, 2002).

## CLOSTRIDIUM BOTULINUM

### Algemene kenmerken

*Clostridium botulinum* is een grampositieve, strikt anaerobe, sporen- en neurotoxinevormende bacterie. De bacteriën of sporen komen overwegend voor in de bodem of in een aquatisch milieu. De sporen overleven zeer lang in het milieu en zijn goed bestand tegen hitte, bevriezing en uitdroging. *Clostridium botulinum* toxinen worden gevormd door de actief groeiende vegetatieve vormen van *Clostridium botulinum* van zodra zich gunstige omstandigheden (bijvoorbeeld in krengen van gestorven dieren) voor-

doen met betrekking tot temperatuur, wateractiviteit, pH, de aanwezigheid van organisch materiaal en de afwezigheid van zuurstof (Haesebrouck, 2006).

### Serotypen en eigenschappen

*Clostridium botulinum* wordt onderverdeeld in 7 hoofdserotypen (A, B, C, D, E, F, G) op basis van de serologische specificiteit van de aangemaakte toxinen en in 4 metabole groepen (I, II, III, IV) op basis van hun biochemische eigenschappen. Bacteriën van de groepen I en II produceren toxinen van de serotypen A, B, E en F, die botulisme bij mensen veroorzaken. Groep III bestaat uit *Clostridium botulinum* serotype C en serotype D die bijna uitsluitend een rol spelen in de ontwikkeling van botulisme bij huisdieren (Dodds en Austin, 1997, Fack *et al.*, 1998, Shapiro *et al.*, 1998). Tot groep IV behoort *Clostridium botulinum* serotype G (Dodds en Austin, 1997). Daarnaast kunnen ook *Clostridium baratii* en *Clostridium butyricum* respectievelijk toxinen van het type F en E produceren, maar deze toxinetypen zijn voornamelijk pathogeen voor de mens (typen F en E) en voor visen en vogels (type E) (Peck *et al.*, 2004).

### Aanwezigheid van *Clostridium botulinum* in levensmiddelen (o.a. in melkproducten)

Ook al is *Clostridium botulinum* theoretisch anaeroob, toch kan de bacterie in gunstige omstandigheden uitgroeien in niet-hermetisch gesloten verpakkingen. De levensmiddelen die het vaakst bij botulisme zijn betrokken zijn groente- of vleesconserven (met inbegrip van op olie bewaarde groenten), vis en visserijproducten, rauwe gedroogde of gekookte vleeswaren en ook bepaalde zuivelproducten (smeerkaasbereidingen met een pH-waarde hoger dan 5 en met een hoog vochtgehalte). De aanwezigheid van *Clostridium botulinum* sporen en toxinen werd beschreven in mascarponekaas en andere melkproducten (Franciosa *et al.*, 1999).

### BOTULISME BIJ DE MENS

De mens is gevoelig voor *Clostridium botulinum* toxintype A, B, E en (zelden) voor type F. Botulisme bij de mens komt meestal voor als een voedselintoxicatie door de inname van vooraf in het voedsel gevormde botulismetoxinen. Voedseltoxico-infectie door de inname van *Clostridium botulinum* bacteriën of sporen waarna deze zich in het maagdarmlkanaal ontwikkelen en toxinen produceren, komt zeer zelden voor omdat de darmmicroflora de vermenigvuldiging van *Clostridium botulinum* belet. Mensen van wie de darmmicroflora een wijziging onderging als gevolg van een darmoperatie, een langdurige antimicrobiële behandeling of een maagdarmaandoening, kunnen echter wel gevoelig zijn voor dit soort infectie. Anderzijds zijn ook baby's gevoelig voor infantiel botulisme omdat hun darmmicroflora nog onvoldoende is ontwikkeld. Ook via wondinfectie kunnen zich sporen van *Clostridium botulinum* ontwikkelen en toxinen aanmaken.

Botulisme bij de mens is een vrij zeldzame ziekte die echter uitermate ernstig is en in 10% van de ge-

vallen dodelijk afloopt. De letale dosis voor de mens wordt geschat op 1 ng/kg lichaamsgewicht (Gill, 1982). In België werden tussen 1990 en 2006 12 gevallen (8 haarden) van humaan botulisme vastgesteld die werden veroorzaakt door serotype A of vooral serotype B. In 7 haarden was de oorzaak van het botulisme voedselgerelateerd (gekookte ham, rauwe ham, aardappelen met uien en spek, olijven) (Kimpe, 2006).

### KWALITATIEVE RISICO-EVALUATIE VOOR HET OPTREDEN VAN HUMAAN BOTULISME VIA DE CONSUMPTIE VAN MELK

Zolang de diagnose van botulisme op een melkveebedrijf niet bevestigd is door de identificatie van het neurotoxine is het moeilijk om een risico-evaluatie uit te voeren. Eens de diagnose bevestigd is, kan het risico op humaan botulisme worden beoordeeld door een stapsgewijze studie van de verspreiding van het gevaar in de voedselketen.

Verschillende schakels in de voedselketen dienen doorlopen te worden vooraleer *Clostridium botulinum* toxinen of sporen aanwezig in het voeder van de koe terecht komen bij de mens. Binnen elke schakel kan het risico worden beoordeeld rekening houdend met bepaalde veronderstellingen en onzekerheden. Deze schakels worden schematisch weergegeven (Figuur 1). Door gebrek aan kwantitatieve gegevens is deze risicobeoordeling gesteund op een kwalitatieve evaluatie (Dewulf, 2007).

### Risico op aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxine of sporen in ruwvoer

Botulisme bij rundvee wordt veroorzaakt door de rechtstreekse inname van een vooraf gevormd toxine via het voeder of het drinkwater. Risicofactoren voor de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxinen of sporen in het voeder zijn het verstrekken van vochtig hooi, slecht bewaarde kuil of natte bierbostel en meer bepaald de aanwezigheid daarin van kadavers van gevogelte of krengen van ongedierte of andere dieren (bijvoorbeeld katten, vossen). De precieze besmettingsbron is evenwel niet altijd te lokaliseren en te identificeren. De aanwezigheid van pluimvee op hetzelfde bedrijf of op een naburig bedrijf is een risicofactor waarbij in ontbinding verkerende pluimveekarkassen een bron van toxinen kunnen zijn (De Herdt *et al.*, 1991, Liversey *et al.*, 2004, Otter *et al.*, 2006).

Na een uitbraak van botulisme type B op een rundveebedrijf als gevolg van het bijvoederen van gecontamineerde bierbostel werd een persisterende contaminatie van ruwvoer (grassilo) met *Clostridium botulinum* beschreven als gevolg van kringlopen van fecale excretie, de contaminatie van weiden na bemesting, een verdere ontwikkeling van *Clostridium botulinum* in grassilo's en tenslotte de opname van het besmet silovoeder door de koeien. Er werd een correlatie vastgesteld tussen de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* type B in feces en in grassilo's. (Notermans *et al.*, 1981).

In het geval van een verdenking van de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxine in het ruwvoer situeert de onzekerheid zich in de identificatie

van het type van het toxine en in het gebrek aan kennis van de lokalisatie en de omvang van de contaminatie in het ruwvoeder en de concentratie van het gepreformeerd toxine.

Samenvattend bestaat er een hoog risico op de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxine of sporen in ruwvoeder, zeker bij minderwaardige (bewaard) kwaliteit en zeker indien dit voeder krenge van ongedierte of van gevoegelte bevat.

#### Risico op ontwikkeling van botulisme bij melkvee na opname van *Clostridium botulinum* toxine of sporen via het voeder

De kans dat koeien botulisme ontwikkelen na de opname van *Clostridium botulinum* toxinen is hoog aangezien melkvee bijzonder gevoelig is voor botulisme. Volgens Moeller *et al.*, (2003) bedraagt de gemiddelde toxische dosis botulinumtoxine type C bij koeien 0,4 ng/kg, hetgeen betekent dat koeien, op gewichtsbasis, 13 keer gevoeliger zijn dan muizen. Afhankelijk van de hoeveelheid botulinumtoxine die is opgenomen, verlopen de symptomen al dan niet fulminant. Het ziektebeeld kan zich aldus beperken tot enkele dieren of tot een groot aantal dieren en dit gedurende een korte of lange periode. Er is geen reden om aan te nemen dat koeien minder gevoelig zouden zijn voor de ontwikkeling voor botulisme na de opname van *Clostridium botulinum* toxinen type B. Dit blijkt indirect uit de beschrijving van het klinisch verloop van dergelijke botulisme-intoxicaties op aangestaste rundveebedrijven (Kelch *et al.*, 2000).

Voor het inschatten van het risico bestaat evenwel steeds de onzekerheid over het aantal koeien dat

*Clostridium botulinum* toxinen heeft opgenomen in een koppel en zich in de incubatiefase bevindt, over de duur ervan en over het uiteindelijk aantal dieren dat botulisme zal ontwikkelen.

De loutere opname van *Clostridium botulinum* sporen door herkauwers geeft in de regel geen aanleiding tot kiemvermenigvuldiging en toxinevorming.

Samenvattend is ondermeer op basis van experimentele gegevens de kans op de ontwikkeling van botulisme bij rundvee na de blootstelling aan *Clostridium botulinum* type B, C en D toxinen hoog. Er is geen risico op de ontwikkeling van botulisme bij herkauwers na een loutere opname van *Clostridium botulinum* sporen.

#### Risico op aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxine of sporen in de melk op een bedrijf met botulisme

Niettegenstaande de directe overdracht van *Clostridium botulinum* toxinen van een besmet dier naar de melk nog bijna nooit kon worden aangetoond, mag deze mogelijkheid toch niet worden uitgesloten. De belangrijkste risicoperiode voor het voorkomen van botulinumtoxine in de melk situeert zich in theorie tijdens de vroege infectiefase nadat het dier werd blootgesteld aan het toxine via de voeding en vóór het moment dat klinische symptomen worden vastgesteld. Er zijn aanwijzingen dat het toxine meteen na de blootstelling in de bloedsomloop aanwezig is (Cobb *et al.*, 2002). Het toxine kan doorgaans niet worden opgespoord in het bloed van klinisch aangestaste dieren. Dit is te wijten aan de geringe gevoeligheid van de huidige diagnostische tests (Haagsma

VOEDSELKETEN	TOXINE	SPOREN
RUWVOEDER	HOOG RISICO op aanwezigheid bij minderwaardige kwaliteit	HOOG RISICO op aanwezigheid bij minderwaardige kwaliteit (serotype B)
KOE	HOOG RISICO op botulisme	GEEN RISICO op botulisme
MELK	LAAG tot ZEER LAAG RISICO op aanwezigheid	HOOG RISICO op aanwezigheid bij serotype B door fecale contaminatie
VERWERKTE MELK	ZEER LAAG tot GEEN RISICO op aanwezigheid i.f.v. hittebehandeling LAAG RISICO voor zuivelproducten op basis van rauwe melk	LAAG RISICO op aanwezigheid i.f.v. hittebehandeling
MENS	ZEER LAAG tot GEEN RISICO op botulisme bij serotype C, D LAAG RISICO op botulisme bij serotype B	RISICO op botulisme bij serotype B bij gevoelige personen en baby's

Figuur 1. Risico op de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* serotype C, D of B in de verschillende schakels van de voedselketen en risico op humaan botulisme.

en Ter Laak, 1990; Haesebrouck *et al.*, 1990). Het Britse Voedselagentschap (Report on botulism in cattle, FSA, 2006) vestigt de aandacht op de mogelijkheid van de aanwezigheid van botulinumtoxinen in de melk van koeien met mastitis. Het verwijst hierbij naar een publicatie van Böhnelt *et al.* (2005) die de aanwezigheid van neurotoxine type B beschreven hebben in de melk bij een koe met botulisme en mastitis.

Er zijn daarentegen verschillende elementen die pleiten tegen de mogelijke overdracht van toxinen naar de melk. In de literatuur werden geen rapporten teruggevonden waarin vermeld wordt dat melk of vers vlees van rundvee met botulisme aan de oorsprong ligt van ziekte bij mensen (Cobb *et al.*, 2002). Dit wijst erop dat ofwel mensen weinig of minder gevoelig zijn voor botulinumtoxinen die rundvee aantasten, ofwel dat de toxinen niet (of in zeer lage dosis) uitgescheiden worden in melk of weinig tot niet actief zijn wanneer ze door de mens worden opgenomen. Verder zijn er ook geen rapporten bekend van zoogkalveren met botulisme (Cobb *et al.*, 2002) in aangetaste kuddes, hetgeen andermaal wijst op een geringe waarschijnlijkheid dat toxinen van *Clostridium botulinum* in de melk worden uitgescheiden.

Indien *Clostridium botulinum* toxinen toch worden uitgescheiden in de melk door koeien in de pre-klinische fase dan speelt op bedrijfsniveau nog steeds het effect van dilutie waardoor de concentratie van toxinen in de tankmelk sterk wordt verminderd.

In geval van botulisme type B kan door fecale excretie tijdens de uitbraak (tot  $10^5$  kolonie vormen eenheden *Clostridium botulinum* per gram mest), maar ook lange tijd erna, besmetting van de uier en de melk optreden door persistentie van de kiem op het bedrijf (Notermans *et al.*, 1981).

Samenvattend is het risico op de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxinen in de melk op een bedrijf met botulisme laag tot zeer laag, zeker als er wordt van uitgegaan dat melk van zieke koeien niet in de voedselketen terechtkomt. Het risico op fecale contaminatie van melk met *Clostridium botulinum* sporen is hoog op bedrijven met botulisme type B.

### Risico op aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxine of sporen in verwerkte melk of in melkproducten

In de levensmiddelenindustrie steunt de bescherming tegenover *Clostridium botulinum* op de afdoding van sporen door hittebehandeling (sterilisatie) en op het afremmen van de kieming en groei van de sporen van *Clostridium botulinum* door het toepassen van subminimale interne en/of externe groeiomstandigheden.

Toxinen van *Clostridium botulinum* worden doorgaans snel geïnactiveerd door een verhitting vanaf 80°C. De inactivatie hangt evenwel af van de kenmerken van het levensmiddel. Om een volledige inactivatie van botulinumtoxine te bekomen, wordt aanbevolen het levensmiddel gedurende 5 tot 15 minuten te verhitten tot 100°C (Gélinas, 1995).

Pasteurisatie vernietigt de vegetatieve cellen van *Clostridium botulinum*. De sporen ervan zijn echter beter tegen verhitting bestand. De sporen van niet-

proteolytische stammen (stammen die toxinen voortbrengen van type E en sommige stammen die toxinen van type B, C, D en F voortbrengen) zijn in zekere mate gevoelig voor pasteurisatie maar de doeltreffendheid van de inactivatie door pasteurisatie hangt af van de voedselmatrix waarin de sporen zich bevinden (Molin *et al.*, 1967). De sporen van proteolytische stammen (stammen die toxinen voortbrengen van type A en sommige stammen die toxinen van type B, C, D en F voortbrengen) zijn het beste tegen verhitting bestand. Het pasteuriseren volstaat niet om deze sporen af te doden. Pasteurisatie biedt dus onvoldoende garanties op de inactivatie van sporen van *Clostridium botulinum*.

De sterilisatie van melk biedt daarentegen wel een goede garantie voor de bescherming van de volksgezondheid tegen *Clostridium botulinum* sporen omdat de sterilisatiebarema's steunen op het afdoden van sporen van proteolytische *Clostridium botulinum* type A, die als de meest resistente worden beschouwd. Bij een sterilisatiekracht gelijk aan 3 (dit is het minimumbarema voor een sterilisatie overeenkomend met een thermische behandeling gedurende 3 minuten bij 121,1°C) wordt het aantal sporen met een factor  $10^{12}$  verminderd. De UHT-behandeling van melk (ultra high temperature: doorgaans 2 tot 5 seconden bij 140°C) heeft een gelijkaardig effect op de afdoding van sporen van *Clostridium botulinum* als sterilisatie. Zowel sterilisatie als UHT-behandeling biedt voldoende garanties op de inactivatie van sporen van *Clostridium botulinum*.

Melk kan met *Clostridium botulinum* type B-sporen worden besmet via een fecale verontreiniging van de uier (Notermans *et al.*, 1981). Sommige typen van *Clostridium botulinum* sporen kunnen bij een lage temperatuur kiemen (psychrotrofe typen), zich vermenigvuldigen en toxinen aanmaken (Lindström *et al.*, 2006). Vandaar het belang om bij de melkwinning de hoogste mate van hygiëne te hanteren.

Samenvattend varieert het risico op de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* toxine of sporen, afhankelijk van de toegepaste hittebehandeling, van zeer laag tot onbestaand, bijvoorbeeld na sterilisatie in verwerkte melk of melkproducten. Het grootste risico betreft rauwe melk en producten op basis van rauwe melk.

### Risico op ontwikkeling van botulisme bij de mens na consumptie van melk afkomstig van melkveebedrijven met botulisme

Bij deze risico-evaluatie wordt uitgegaan van melkconsumptie door gezonde volwassen personen en van het feit dat melk van zieke dieren niet in de voedselketen terechtkomt.

In de eerste plaats dient het risico voor de mens afgewogen te worden in functie van het serotype van *Clostridium botulinum* toxine. De mens is vooral gevoelig voor de toxinen type A, B en E. Runderen zijn gevoelig voor de toxinen type B, C en D. Een aantal wetenschappelijke referenties stelt dat serotype C en serotype D alleen een rol spelen in de ontwikkeling van botulisme bij dieren en niet bij de ontwikkeling van botulisme bij mensen (CDC, 1998; Shapiro *et al.*, 1998). Enkel oude literatuurbronnen maken melding

van botulisme bij de mens veroorzaakt door serotype C (Prevot *et al.*, 1955) en serotype D (Demarchi *et al.*, 1958). De gevoeligheid van de mens voor *Clostridium botulinum* toxinen type C en D werd evenwel niet bevestigd (Roberts en Gibson, 1979). Anderzijds is botulinum serotype B een belangrijke oorzaak van botulisme bij de mens en botulinumtype B toxemie werd beschreven bij rundvee (Divers *et al.*, 1986). De kans op de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* type B-toxinen en -sporen in rauwe melk is niet onbestaand.

Vervolgens dient nagegaan te worden in welke mate het toxine vernietigd wordt door de processing van de melk. Pasteurisatie blijkt onvoldoende garanties te bieden voor de inactivatie van de sporen van *Clostridium botulinum*. Sterilisatie en UHT-behandeling bieden deze garanties wel (zie hoger).

Samenvattend is het risico voor de gezondheid van de mens na consumptie van melk afkomstig van veehouderijen met botulisme respectievelijk zeer laag tot afwezig bij serotype C en D en laag bij serotype B. Dit is gesteund op het feit dat:

- melk van asymptomatische koeien in de incubatiefase vermoedelijk geen tot hoogstens zeer lage dosissen toxinen bevat,
- een verdunningseffect optreedt bij eventueel aanwezige toxinen bij de bewaring van de melk op het bedrijf en bij de ophaling van de melk door de fabriek,
- bij sterilisatie of UHT-behandeling van de melk het toxine wordt vernietigd,
- de mens niet gevoelig is voor botulismetype C of D, maar wel voor type B.

Er bestaat evenwel een risico op de ontwikkeling van botulisme bij de opname van serotype B-sporen door gevoelige personen aangezien in bepaalde omstandigheden van gewijzigde of nog niet volledig ontwikkelde darmmicroflora (bij baby's) kiemontwikkeling en toxineproductie kunnen optreden. Een geval van infantiel botulisme werd beschreven na de opname van melkpoeder besmet met *Clostridium botulinum* type B (Brett *et al.*, 2005). Bovendien bestaat de mogelijkheid dat de sporen zich in rauwe of laag verhitte melk- en zuivelproducten ontwikkelen en toxinen vormen.

#### MAATREGELEN BIJ (VERDENKING VAN) BOTULISME OP MELKVEEBEDRIJVEN

Volgens art. 8. §1. van het Koninklijk Besluit van 14 november 2003 betreffende autocontrole, meldingsplicht en traceerbaarheid in de voedselketen dient "elke exploitant het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen onverwijld in kennis te stellen als hij van mening is of redenen heeft om aan te nemen dat een door hem ingevoerd, geproduceerd, gekweekt, geteeld, verwerkt, vervaardigd of verhandeld product schadelijk kan zijn voor de gezondheid". De exploitant dient tevens het FAVV in kennis te stellen van de maatregelen die hij heeft genomen om de risico's te voorkomen. De volgende maatregelen komen hiervoor in aanmerking. Het basisprincipe is dat melk van zieke dieren niet in de voedselketen terechtkomt.

#### Maatregelen op melkveebedrijven in geval van verdenking van botulisme

De verdenking van botulisme op een melkveebedrijf wordt ingesteld op basis van de anamnese en de typische klinische ziektekenen en sterfte bij meerdere dieren, en van de afwezigheid van de identificatie van het toxine bij zieke of gestorven dieren of in het voeder dat zij hebben opgenomen, en van de afwezigheid van de identificatie van mogelijke andere oorzaken (zie differentiaaldiagnose).

Omwille van de onzekerheid over de oorzaak van de neurologische afwijkingen en sterfte op een bedrijf van voedselproducerende dieren verdacht van botulisme dient het voorzorgsbeginsel te worden toegepast. Hierbij wordt verwezen naar de aanbevelingen van het Britse Food Standard Agency (Report on botulism in cattle, 2005) en naar het advies van het Wetenschappelijk Comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (Advies 45-2006). De beschreven maatregelen berusten grotendeels op een artikel van Cobb *et al.* uit 2002 en bestaan uit een verbod op de verkoop van melk tot minimum 17 dagen na het vaststellen van klinische symptomen bij het dier dat het laatst is ziek geworden. Deze periode houdt rekening met de maximale incubatieduur voor *Clostridium botulinum*. Indien een andere oorzaak dan *Clostridium botulinum* geïdentificeerd wordt, moet deze periode aangepast worden in functie van de incubatieduur van dit agens en het risico voor de mens.

Er dient vermeld te worden dat het Britse FSA eind 2006 (Report on botulism in cattle, 2006) evenwel zijn advies heeft versoepeld met betrekking tot bedrijven verdacht van botulisme. Volgens dat advies dienen er geen beperkingen meer te worden opgelegd op melk of vlees afkomstig van runderen van bedrijven verdacht van botulisme. Deze versoepeling berust volgens dit advies op het feit dat botulisme type C of D zelden wordt geassocieerd met humaan botulisme; dat er geen rapporten zijn over humaan botulisme na consumptie van vlees of melk afkomstig van besmette bedrijven en dat zoogkalveren op aangetaste bedrijven geen botulisme ontwikkelen. In België wordt deze versoepeling omwille van het voorzorgsprincipe niet toegepast, ook al omdat in de toestand van een verdenking van botulisme het toxine niet geïdentificeerd is.

Aangezien het aanwezige ruwvoeder verdacht is als bron van het botulismetoxine is een nauwgezette inspectie van de kwaliteit van het ruwvoeder noodzakelijk waarbij de aandacht uitgaat naar een mogelijke verontreiniging door rottende krengen (gevogelte, knaagdieren, ...), aarde en schimmelvorming. Verdacht ruwvoeder mag niet meer worden gevoederd en niet worden verspreid over het grasland om het gevaar voor overdracht op de dieren te beperken. Het verdacht ruwvoeder kan eventueel wel diep worden ondergeploegd op akkerland. Het watercircuit in de stallen wordt het best gespoeld en er kan tijdelijk worden overgeschakeld op leidingwater.

### Maatregelen op melkveebedrijven in geval van bevestiging van botulisme

De bevestiging van botulisme op een melkveebedrijf berust op de anamnese en de typische klinische ziekte tekens en sterfte bij meerdere dieren, en op de identificatie van het toxine bij zieke of gestorven dieren, en op de afwezigheid van de identificatie van mogelijke andere oorzaken (zie differentiaaldiagnose).

Bij de bevestiging van botulisme dient een onderscheid gemaakt te worden tussen botulisme type C of D en botulisme type B (pathogeen voor de mens).

### Botulisme veroorzaakt door *Clostridium botulinum* type C of D-toxine

Niettegenstaande *Clostridium botulinum* type C of D niet in verband wordt gebracht met ziekte bij de mens, is het belangrijk dat maatregelen worden genomen omdat de aanwezigheid van zieke dieren in een bedrijf kan wijzen op een algemene verslechtering van de hygiëne of er de oorzaak van kan zijn, hetgeen een risico vormt voor de volksgezondheid en voor de kwaliteit van de geproduceerde melk. Zelfs als slechts één type toxine (C of D) geïdentificeerd wordt, is het nog mogelijk dat andere typen (bijvoorbeeld type B) van *Clostridium botulinum* tegelijkertijd voorkomen (Böhnel *et al.*, 2005). Tevens is het in de praktijk moeilijk haalbaar om melk van gezonde dieren gescheiden te houden van melk afkomstig van zieke dieren.

Volgens het advies 45-2006 van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV mag melk afkomstig van gezonde koeien op een bedrijf waar botulisme type C of D werd bevestigd in de consumptieketen worden gebracht, op voorwaarde dat de melk van het bedrijf gesteriliseerd of UHT-behandeld wordt voor een periode van minstens 17 dagen vanaf het optreden van het laatste geval van botulisme in het bedrijf, dit om de sporen te vernietigen en de toxinen te inactiveren. Verder mag de melk afkomstig van zieke dieren niet in de voedselketen terechtkomen. De zuivelsector dient steeds te kunnen instaan voor specifieke traceringscontroles om te verzekeren dat de melk afkomstig van bedrijven met botulisme gesteriliseerd werd. Deze melk mag niet worden gebruikt voor verdere transformatie die geen sterilisatie inhoudt, zoals bijvoorbeeld voor de productie van melkpoeder.

De te nemen maatregelen met betrekking tot het ruwvoer of het drinkwater zijn dezelfde als hierboven beschreven. Als in de handel aangekocht diervoer de bron van intoxicatie blijkt te zijn, is een stroomopwaartsonderzoek, met een tracing van de oorsprong van de voeders, noodzakelijk om eventueel andere bedrijven te identificeren die ook getroffen kunnen zijn.

### Botulisme veroorzaakt door *Clostridium botulinum* type B toxine

Indien het voor de mens pathogene *Clostridium botulinum* type B wordt vastgesteld op een melkveebedrijf bestaat de meest veilige maatregel eruit om alle bedrijfsmelk uit de voedselketen te weren gedurende de volledige incubatieduur (minstens 17 dagen) van

af het optreden van het laatste geval van botulisme in het bedrijf (Cobb *et al.*, 2002). In principe zou kunnen overwogen worden om ook deze melk in consumptie te brengen na de sterilisatie van de melk vermits de toxinen en de sporen worden vernietigd.

De te nemen maatregelen met betrekking tot het ruwvoer of het drinkwater zijn dezelfde als hierboven beschreven. Er wordt verder aangeraden om in geval van de aanwezigheid van zieke dieren op een melkveebedrijf, de dieren tot minstens 17 dagen nadat de eerste symptomen bij het laatste dier werden vastgesteld op het bedrijf te houden om de fecale verspreiding van de sporen door de zieke dieren of de dieren in incubatie te vermijden (Notermans *et al.*, 1981).

### DISCUSSIE EN BESLUIT

In ons land worden sporadisch uitbraken van botulisme bij melkvee waargenomen. Het is niet duidelijk wat de reële incidentie is aangezien men vermoedt dat niet alle gevallen worden gemeld aan het FAVV. Het is wel opvallend dat de meldingen zich allemaal in de provincie West-Vlaanderen situeren. In 3 van de 4 beschreven gevallen werd *Clostridium botulinum* type D-toxine geïsoleerd.

Zowel het Franse (AFSSA, 2002) als het Britse Voedselagentschap (FSA, 2005, 2006) stelde een toename vast van respectievelijk botulisme type E bij pluimvee en van type C en D bij rundvee. Er werd een verband gelegd tussen het optreden van botulisme bij rundvee en contacten van runderen met pluimveemest of -kadavers. Ook in Duitsland (Böhnel en Gessler, 2003) werd een toename van de incidentie van botulisme vastgesteld.

Uitbraken van botulisme komen af en toe voor op melkveehouderijen. Daarbij komt na een periode van progressief verlopende motorische paralyse sterfte bij meerdere dieren voor. Door het ontbreken van een gevoelige en snelle diagnostische test kan het soms enkele weken duren vooraleer een etiologische diagnose wordt gesteld door serotype-identificatie van het toxine. Momenteel wordt hiervoor de muisletaliteit bioassay gebruikt. Dit is een proefdieronvriendelijke test die eerder complex is om uit te voeren en bovendien slechts bij ongeveer 15 % van de aangetaste runderen het toxine kan aantonen. Als alternatief werden immunologische testen beschreven voor het opsporen van het toxine. De meest gebruikte methode is de ELISA. De gevoeligheid van een conventionele ELISA is 10 tot 100 maal lager dan deze van de muistest. Via verschillende methoden kan men evenwel komen tot een amplificatie van het signaal, waardoor de gevoeligheid toeneemt (Lindström en Korkeala, 2006). Veelbelovende testen zijn de zogenaamde endopeptidaseassays. Het botulinum neurotoxine heeft namelijk een zeer specifieke zink-endopeptidaseactiviteit die *in vivo* inwerkt op specifieke proteïnen die voorkomen in de synaptische ruimte. De endopeptidaseassays zijn gebaseerd op het feit dat de verschillende botulinum neurotoxinen op welbepaalde plaatsen inwerken op synaptische proteïnen, waarbij peptiden vrijgesteld worden die dan gedetecteerd worden. Ze zijn zeer specifiek en er treedt geen kruisreactie op tussen de verschillende botulinumtoxinen. Dergelij-



ke testen zouden de muisletaliteit bioassays op termijn kunnen vervangen omdat ze alleen biologisch actieve toxine detecteren en in het algemeen gevoeliger zijn dan de muistesten (Lindström en Korkeala, 2006). Verder onderzoek is nodig om te komen tot een snelle en performante diagnostische test ter identificatie van het *Clostridium botulinum* toxine bij (verdenking van) botulisme bij rundvee.

Op dit ogenblik zijn er niet voldoende gegevens over de farmacokinetiek en -dynamiek van de verschillende *Clostridium botulinum* toxinen bij herkauwers. Als dusdanig is het dan ook onmogelijk om een kwantitatieve risico-evaluatie uit te voeren. Uit de kwalitatieve risico-evaluatie blijkt evenwel dat de kans op de overdracht van toxinen via verwerkte melk naar de consument zeer laag tot onbestaande is. Het grootste risico wordt gevormd door de fecale contaminatie van de uier en melk door *Clostridium botulinum* sporen, hetgeen in het geval van type B een risico op botulismeontwikkeling inhoudt voor de mens.

Tot dusver zijn er in België geen gevallen bekend van botulisme bij de mens na consumptie van melk of melkproducten (persoonlijke mededeling, WIV-Pasteur Instituut).

Het blijft evenwel noodzakelijk, zoals de wet het trouwens verplicht, dat gevallen van botulisme op rundveebedrijven worden gemeld aan het FAVV en worden opgevolgd. Op die manier kan nagegaan worden in welke mate een epidemiologische evolutie optreedt in het voorkomen van de verschillende *Clostridium botulinum* serotypen en in het bijzonder van de typen die pathogeen zijn voor de mens.

Als preventieve maatregelen ter voorkoming van botulisme op melkveebedrijven kan verder worden aangeraden (FSA, 2006) om contacten te vermijden tussen melkvee en kregen van ongedierte of gevogelte (in silovoeder) of met mest van vleeskippenbedrijven. Kippenmest wordt daarom het beste niet gebruikt als bedding voor rundvee en het bemesten van weiden met kippenmest is af te raden. Er dient op geteld te worden dat niet dezelfde vervoermiddelen worden gebruikt voor het transport van pluimveemest en van diervoeder tenzij na een grondige reiniging en desinfectie. Grasland mag niet te kort worden gemaaid en voorzichtigheid is geboden bij het inkuielen van gras afkomstig van weiden gelegen in een overstromingsgebied. Tenslotte dient ieder contact vermeden te worden tussen levende dieren en kadavers.

Een fecale contaminatie van uier of melk met *Clostridium botulinum* sporen dient vermeden te worden door het in acht nemen van de principes van goede hygiënische melkwinning.

## REFERENTIES

- Advies 45-2006 van het Wetenschappelijk Comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen ([http://www.favv-afvsa.fgov.be/home/com-sci/avis06\\_nl.asp](http://www.favv-afvsa.fgov.be/home/com-sci/avis06_nl.asp))
- AFSSA 2002. Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine. <http://www.afssa.fr/documents/Sant-Ra-Botulisme.pdf>
- Böhnelt H., Gessler F. (2003). Diagnosis of botulism since 1995. A report of experience (in German). *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 116, 269-273.
- Böhnelt H., Neufeld B., Gessler F. (2005). Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism. *Veterinary Journal* 169, 124-125.
- Brett M.M., Mc Laughlin J., Harris A., O'Brien S., Black N., Forsyth R.J., Roberts D., Bolton F.J. (2005). A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. *Journal of Medical Microbiology* 54, 769-776.
- Bruckstein S., Tromp A.M. (2001). Food poisoning in three family dairy herds associated with *Clostridium botulinum* type B. *The Israel Veterinary Medical Association* 56, 3.
- Centers for Disease Control and Prevention (1998). Botulism in the United States, 1899-1996. In: Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory workers, Atlanta, GA. (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/botulism.pdf>)
- Chiers K., Haesebrouck F., Devriese L. (1998). Een uitbraak van botulisme bij runderen veroorzaakt door *Clostridium botulinum* type B. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 67, 296-299.
- Cobb S.P., Hogg R.A., Challoner D.J., Brett M.M., Livesey C.T., Sharpe R.T., Jones T.O. (2002). Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *The Veterinary Record* 150, 5-8.
- De Herdt P., Haesebrouck F., Haagsma J., Devriese L.A., Dom P., Moens J. (1991). Een uitbraak van botulisme bij runderen met hoge morbiditeit en mortaliteit. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 60, 216-218.
- Demarchi J., Mourgues C., Orio J., Prevot A.R. (1958). Existence du botulisme humain de type D. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 142, 580-582.
- Dewulf J. (2007). Risico-analyse in de Diergeneeskunde. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 76, 369-372.
- Divers T. J., Bartholomew R.C., Messick J.B., Whitlock R.H., Sweeney R.W. (1986). *Clostridium botulinum* type B toxicosis in a herd of cattle and a group of mules. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188, 382-386.
- Dodds K.L., Austin J.W. (1997). *Clostridium botulinum*. In: Doyle M.P. en Beuchat L.R. (editors). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology press.
- Food and Standard Agency (2005). Advisory Committee on the microbiological safety of food – Ad hoc group on botulism in cattle – Report on botulism in cattle, december 2005, [www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsf2006botulismcattle.pdf](http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsf2006botulismcattle.pdf)
- Food and Standard Agency (2006). Advisory Committee on the microbiological safety of food – Ad hoc group on botulism in cattle – Report on botulism in cattle, September 2006, [www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/botulismcattlereport.pdf](http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/botulismcattlereport.pdf)
- Franciosa G., Pourshaban M., Gianfranceschi M., Gattuso A., Fenicia L., Ferrini A., Mannoni V., De Luca G., Aureli P. (1999). *Clostridium botulinum* spores and toxin in mascarpone cheese and other milk products. *Journal of Food Protection*, 62, 867-871.
- Gélinas P. (1995). Répertoire des micro-organismes pathogènes transmis par les aliments. Agroculture et agroalimentaire, Edisem (éditeur), Canada.
- Gill D.M. (1982). Bacterial Toxins: a Table of Lethal



- Amounts. *Microbiological Reviews*, 46, 86-94.
- Haagsma J., Ter Laak E.A. (1978). Atypische gevallen van botulismus type B bij runderen, veroorzaakt door de bijvoeding van bierbostel. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 103, 312-325.
- Haagsma J., Ter Laak E.A. (1978). Een geval van botulismus type B bij runderen veroorzaakt door de voeding van kuilgras. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 103, 910-912.
- Haesebrouck F., Haagsma J., Devriese L., Bertels G., D'Hollander L. (1990). Een uitbraak van botulisme bij paarden met atypische symptomen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 59, 234-236.
- Kelch W.J., Kerr L.A., Pringle J.K., Rohrbach B.W., Whitlock R.H. (2000). Fatal *Clostridium botulinum* toxicosis in eleven Holstein cattle fed round bale barley haylage. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 453-455.
- Kimpe A.J. (2006). Gegevens over *Clostridium botulinum* van het Referentielaboratorium. [www.iph.fgov.be/epidemie/epinl/plabnl/plabannl/06\\_002n\\_r.pdf](http://www.iph.fgov.be/epidemie/epinl/plabnl/plabannl/06_002n_r.pdf)
- Koninklijk Besluit van 14 november 2003 betreffende autocontrole, meldingsplicht en traceerbaarheid in de voedselketen. *Belgisch Staatsblad van 12 december 2003*, pp 59072-59086.
- Lindström M., Korkeala H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 298-314.
- Liversey C.T., Sharpe R.T., Hogg R.A. (2004). Recent association of cattle botulism with poultry litter. *The Veterinary Record* 154, 734-735.
- Martel J.-L. (2003). Le botulisme des bovins: un danger rare, mais présent. *Le Point Vétérinaire* 238, 24-28.
- McIllroy S.G., Mc Cracken, R.M. (1987). Botulism in cattle grazing pasture dressed with poultry litter. *The Irish Veterinary Journal* 98, 245-248.
- Moeller R.B. (2000). *Clostridium botulinum* type C - median lethal dose and detection of toxin in milk. California Dairy Research Foundation. <http://www.cdrf.org/content.asp?contentID=112>.
- Moeller R.B., Puschner B., Walker R.L., Rocke T., Galey F.D., Cullor J.S., Ardans S.S. (2003). Determination of the median toxic dose of type C botulinum toxin in lactating dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15, 523-526.
- Molin N., Snygg B.G. (1967). Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology* 15, 1422-1426.
- Notermans S., Kozaki S., Schothorst M. (1979). Toxin production by *Clostridium botulinum* in grass. *Applied Environmental Microbiology* 38, 767-771.
- Notermans S., Dufrenne J., Oosterom J. (1981). Persistence of *Clostridium botulinum* type B on cattle farm after an outbreak of botulism. *Applied Environmental Microbiology* 41, 179-183.
- Otter A., Liversey C., Hogg R., Sharpe R., Gray D. (2006). Risk of botulism in cattle and sheep arising from contact with broiler litter. *The Veterinary Record* 159, 186-187.
- Peck M. W., Granum P.E., Gould G.W., Mainil J.G. (2004). *Clostridium botulinum* and foodborne botulism. In: *Foodborne Clostridia and Clostridia*, EU Concerted Action QLK2-CT-2001-01267, 24-33.
- Prévot A.R., Brygoo E.R. (1953). Nouvelles recherches sur le botulisme et ses cinq types toxiques. *Annales de l'Institut Pasteur* 85, 544-575.
- Prévot A.R., Terasse J., Daumail J., Cavaroc M., Rioli J., Sillio R. (1955). Existence en France du botulisme humain de type C. *Bulletin de l'Académie de Médecine (Paris)* 139, 355-358.
- Roberts T.A., Gibson A.M. (1979). The relevance of *Clostridium botulinum* type C in public health and food processing. *Journal of Food Technology* 14, 211-226.
- Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. (1996). In: *Micro-organisms in foods. Characteristics of microbial pathogens*. ICMSF. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, p. 68.
- Shapiro R.L., Hatheway C., Swerdlow D.L. (1998). Botulism in the United States: a clinical and epidemiological review. *Annals of Internal Medicine* 129, 221-228.
- Trueman K.F., Bock R.E., Thomas R.J., Taylor J.D., Green P.A., Roeger H.M., Ketterer P.J. (1992). Suspected botulism in three intensively managed Australian cattle herds. *The Veterinary Record* 130, 398-400.
- Verordening (EG) Nr. 178/2002 van het Europees Parlement en de Raad van 28 januari 2002 tot vaststelling van de algemene beginselen en voorschriften van de levensmiddelenwetgeving, tot oprichting van een Europese autoriteit voor voedselveiligheid en tot vaststelling van procedures voor voedselveiligheidsaangelegenheden. *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen van 1.2.2002*, p. L 31/1 tot L 31/24.